

KEMAMPUAN PENGHAMBATAN BAKTERI ASAM LAKTAT DARI TAPE BIJI TERATAI TERHADAP PATOGENIK ENTERIK (*VIBRIO CHOLERA*, *SALMONELLA THYPI*, *SHIGELLA DISENTRI*, *E. COLI*), ANTIBIOTIK, KETAHANANNYA TERHADAP BILE SALT DAN ASAM

Inhibitory Activity of Lactid Acid Bacteria Isolated from Tape Waterlily Seed to Enteric Pathogenic Bacteria (*Vibrio cholera*, *Salmonella typhi*, *Shigella disenteri*, and *E.coli*) and Its' Susceptibility to Antibiotic, Bile Salt and Acidic Condition

Iin Khusnul Khotimah¹, Rita Khairina¹

¹Jurusan Pengolahan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan Unlam
Jl. A. Yani Km. 36 Banjarbaru Kalimantan Selatan
Email: ritasyaiful@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan penghambatan bakteri asam laktat yang diisolasi dari tape biji teratai terhadap patogenik enterik (*Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, *Shigella disenteri*, *E. Coli ATCC 25922*), antibiotik, bile salt dan asam. Jenis bakteri yang diketahui tumbuh selama fermentasi tape biji teratai adalah *Streptococcus thermophilus* (IKH-1), *Pediococcus pentosaceus* (IKH-2), dan *Leuconostoc mesenteroides* (IKH-8). Pengamatan terhadap uji penghambatan patogenik enterik (*Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, *Shigella disenteri*, dan *E. Coli ATCC 25922*), menunjukkan bahwa *Streptococcus thermophilus* mampu menghambat *Shigella disenteri* dengan luas rata-rata zona hambat sebesar 16,28 mm tetapi tidak mampu menghambat *V. cholera*, *S. typhi* dan *E. coli*. *Pediococcus pentosaceus* mampu menghambat *Vibrio cholera*, dan *Salmonella thypi* dengan luas rata-rata zona hambat 18,59 mm dan 7,91 mm. Sedangkan *Leuconostoc mesenteroides* mampu menghambat *Salmonella thypi* dengan luas rata-rata zona penghambatan 8,25 mm. Penghambatan terhadap antibiotik, bile salt dan asam menunjukkan bahwa *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Leuconostoc mesenteroides* tahan terhadap kloramfenikol pada konsentrasi 0,05mg, tahan terhadap bile salt 2% dan asam (pH 3).

Kata kunci : Tape biji teratai, bakteri asam laktat, probiotik dan pathogen enterik

ABSTRACT

The aim of this research was to observe inhibitory activity of LAB isolated from tape waterlily seed to enteric pathogenic bacteria (*Vibrio cholera*, *Salmonella typhi*, *Shigella disenteri*, *E.coli ATCC 25922*) and it's susceptibility to antibiotic, in bile salt and under acidic condition. Microbia in the tape (a fermented product) of waterlily seed to showed were *Streptococcus thermophilus* (IKH-1), *Pediococcus pentosaceus* (IKH-2) and *Leuconostoc mesenteroides* (IKH-8). *Streptococcus thermophilus* showed inhibition against the growth of *Shigella disenteri* with inhibition zones 16,28 mm, but did not against the growth of *V. Cholera*, *S. typhi*, *E.coli*. *Pediococcus pentosaceus* inhibit *Vibrio cholera*, dan *Salmonella thypi* with inhibition zones 18,59 mm dan 7,91 mm. So that, *Leuconostoc mesenteroides* inhibit *Salmonella thypi* with zones inhibits average 8,25 mm. Chloramfenicol at 0.05 mg concentrations did not show inhibition against the growth of isolated *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. These isolates could survive too in bile salt (2%) and acidified media (pH 3).

Keyword : The tape of waterlily seed, LAB, probiotic and enteric pathogenic

PENDAHULUAN

Tape merupakan makanan produk fermentasi. Pada proses pengolahannya melibatkan mikrobia dominan yaitu yeast atau jamur amilolitik dan fermentatif serta bakteri asam laktat (Rahayu, 2004). Yeast atau jamur amilolitik akan memecah pati menjadi gula sederhana, dan dilanjutkan dengan proses fermentasi oleh fermentatif yeast maupun bakteri asam laktat. Tape pada umumnya dikonsumsi langsung tanpa proses pemasakan lanjut sehingga dapat dikategorikan sebagai makanan probiotik apabila di dalam proses pembuatannya melibatkan bakteri asam laktat sebagai kandidat probiotik.

Tape biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) merupakan makanan hasil fermentasi yang berpotensi sebagai makanan fungsional sebab selama fermentasi produk ini mampu ditumbuhi bakteri asam laktat dan yeast sebanyak 10^7 (Khairina dkk., 2007). Hasil isolasi dan identifikasi terhadap bakteri asam laktat yang tumbuh pada tape biji teratai adalah *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* (Khotimah dan Khairina, 2009). Tape biji teratai berwarna kecoklatan, berasa manis dan beraroma tape yang kuat.

Khairina dkk., (2008) melaporkan bahwa mikroflora feses relawan yang mengonsumsi tape biji teratai terdiri dari bakteri asam laktat sekitar $\log 8,73$ CFU/g – $\log 10,12$ CFU/g, *Lactobacillus* $\log 7,37$ CFU/g – $\log 10,38$ CFU/g dan *Enterobacter* $\log 9,19$ CFU/g – $\log 10,49$ CFU/g. Nilai pH feses relawan yang mengonsumsi tape biji teratai selama 1 bulan berada pada kisaran 6,11 – 6,68 dan secara statistik berbeda nyata.

Menurut Rahayu (2001), makanan fungsional diartikan sebagai makanan yang memiliki ingredien yang memberikan fungsi tubuh secara spesifik disamping kandungan nutrisinya. Makanan fungsional pada prinsipnya adalah makanan yang memiliki efek positif bagi kesehatan manusia. Salah satu syarat bagi mikroba probiotik adalah memiliki kemampuan penghambatan terhadap patogen enterik, *bile salt* dan asam. Tape biji teratai berpotensi menjadi makanan fungsional, tetapi informasi yang ada masih sangat terbatas.

Beberapa permasalahan yang ditemukan dalam upaya mengembangkan tape biji teratai sebagai sumber probiotik adalah belum diketahuinya kemampuan strain mikroba yang diperoleh dari tape biji teratai sebagai probiotik dan anti mikroba sehingga penelitian ini dilakukan untuk menguji kemampuan penghambatan bakteri asam laktat yang diisolasi dari tape biji teratai (*Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Leuconostoc mesenteroides*) terhadap patogen enterik (*Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, *Shigella*

disentri, *E. Coli* ATCC 25922), antibiotik, *bile salt* dan asam. Hasil penelitian diharapkan mampu memberikan informasi mengenai kemampuan tape biji teratai sebagai makanan probiotik.

METODE PENELITIAN

Persiapan Isolat Uji

Tiga jenis isolat yang diisolasi dari tape biji teratai digunakan sebagai isolat uji. Ketiga isolat tersebut adalah *Streptococcus thermophilus* (IKH-1), *Pediococcus pentosaceus* (IKH-2) dan *Leuconostoc mesenteroides* (IKH-8). Sebanyak 0,2 ml kultur uji diinokulasikan ke dalam media NA 100 ml steril sehingga diperoleh konsentrasi 0,2% yang telah siap dituang ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya 20 ml media NA yang telah terisi kultur uji dituangkan ke cawan dan dibiarkan hingga menjadi padat. Setelah padat dibuat sumur-sumur dengan diameter 6 mm, kemudian dimasukkan 30 μ l kultur uji (dlm MRSB) yang berumur 24 jam, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari.

Pengujian Aktivitas Antimikroba (Gariga dkk., 1983)

Pengujian aktivitas antimikroba BAL terhadap bakteri patogen dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran (*Well Diffusion Agar*) (Gariga dkk., 1983). Mula-mula satu mata ose kultur bakteri (*Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentri*, *E. Coli* ATCC 25922) dipindahkan dari agar miring Nutrien Agar (NA) ke dalam 10 ml media cair *Nutrien Broth* (NB) secara aseptik. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk digunakan sebagai kultur uji. Zona penghambatan adalah lebar areal bening yang terbentuk di sekitar sumur yang diukur dengan jangka sorong dengan satuan mm. Ulangan percobaan dilakukan sebanyak 2 kali.

Uji Ketahanan pH Rendah (modifikasi Zavaglia dkk., 1998)

Uji ini untuk mengetahui ketahanan isolat uji terhadap pH rendah. Nilai pH yang dipilih adalah 3,0 yang disesuaikan dengan kondisi lambung manusia. Dan pH 7,0 sebagai kontrol. Kultur uji ditumbuhkan pada GYP Broth (selama 24 jam pada suhu 37°C) dalam tabung steril. Setelah 24 jam inkubasi tabung disentrifugasi selama 10 menit pada 1000 x g. Pellet yang dihasilkan disuspensi kembali dalam GYP Broth baru. Penetapan pH 3,0 dilakukan dengan penambahan 10% (g/l) HCl dan tabung kembali diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah bakteri yang hidup ditumbuhkan pada PGY Agar yang di tambahkan 0,1% (g/l) trypton dan diinkubasi

pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah sel yang berhasil hidup dihitung. Ketahanan isolat uji terhadap pH rendah (Δ penurunan log) dihitung dengan cara mengurangi jumlah koloni kontrol dengan koloni uji pH 3 atau Log (Σ koloni kontrol) – Log (Σ koloni uji pH 3).

Uji Ketahanan Terhadap Antibiotik (Modifikasi dari Gariga dkk., 1983)

Pengujian ketahanan isolat uji terhadap antibiotik dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran (*Well Diffusion Agar*) yang dimodifikasi dari Gariga dkk., (1983). Jenis antibiotik yang dipilih adalah kloramfenikol. Jumlah kultur uji yang diinokulasikan sebanyak 10 log cycle pada media 25 ml NA. Sedangkan jumlah kloramphenikol yang dimasukkan ke dalam masing-masing sumur berdiameter 6mm adalah sebesar 5mg, 0,5mg dan 0,05 mg, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Zona penghambatan adalah lebar areal bening yang terbentuk di sekitar sumur yang diukur dengan jangka sorong dengan satuan mm.

Uji Ketahanan Garam Empedu (modifikasi dari Zavaglia dkk., 1998)

Uji ini bertujuan untuk mengetahui ketahanan isolat uji terhadap garam empedu atau *bile salt* yang terdapat dalam lambung manusia. Konsentrasi garam empedu yang digunakan sebesar 2%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penghambatan isolat uji (*Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Leuconostoc mesenteroides*) terhadap patogen enterik (*Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, *Shigella disenti*, dan *E. Coli ATCC 25922*), ketahanan terhadap antibiotik (kloramphenikol), bile salt 2%, dan asam dapat dilihat pada Tabel 1,2 dan 3.

Tabel 1. Penghambatan Isolat Uji Terhadap Patogenik Enterik

Potogenik enterik	Luas Rata-rata (mm) Zona Penghambatan		
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Vibrio cholera</i>	negatif	18,50	negatif
<i>Salmonella thypi</i>	negatif	7,91	8,25
<i>Shigella disenti</i>	16,28	negatif	negatif
<i>E. Coli ATCC 2592</i>	negatif	negatif	negatif

Tabel 2. Ketahanan Isolat Uji Terhadap Kloramfenikol

Isolat	Luas zona jernih (mm) pada konsentrasi antibiotik		
	5 mg	0,5 mg	0,05 mg
<i>Streptococcus thermophilus</i>	19,67	12,34	8,0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	20,17	16,36	9,67
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	18,80	14,75	0*)

Keterangan : *) = tahan terhadap antibiotik pada konsentrasi 0,05mg

Tabel 3. Ketahanan Isolat Uji Terhadap *Bile Salt* 2% dan Asam

Species	Daya tahan terhadap	
	<i>Bile Salt</i> (2%*)	Asam
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+

Keterangan : *) = medium basal

Metode yang digunakan untuk menguji daya hambat isolat uji terhadap bakteri patogen adalah metode difusi sumuran (*Well Diffusion Agar*) dengan membuat sumur pada media padat yang sudah disiapkan untuk selanjutnya diinokulasikan dengan isolat uji. Aktivitas antimikroba terjadi apabila terbentuk zona bening disekitar sumuran (Wiryanawan dkk., 2003). Besarnya aktivitas penghambatan ditunjukkan dengan ukuran diameter zona jernih yang terbentuk, makin besar diameternya diduga makin besar kemampuan penghambatannya.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga isolat uji yang digunakan mampu menghambat pertumbuhan *Vibrio cholera*, *Salmonella thypi* dan *Shigella disenti*. *Streptococcus thermophilus* menghambat *Shigella disenti* dengan rata-rata zona hambat 16,28 mm, *Pediococcus pentosaceus* menghambat *Vibrio cholera* dan *Shigella disenti* dengan rata-rata diameter zona 18,59 mm dan 7,91. Sedangkan *Leuconostoc mesenteroides* mampu menghambat *Salmonella thypi* dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 16,28 mm. Menurut Lay dan Hastowo (1992), terbentuknya zona hambat bebas bakteri melalui pengamatan daerah jernih di sekeliling kertas cakram atau sumur membuktikan adanya daya kerja antimikrobia.

Lade dkk., (2006) mengklasifikasikan besaran zona hambat bakteri dalam 3 kriteria, yaitu kriteria sedang (*moderate inhibition*) antara 6 – 9 mm, kriteria kuat (*strong inhibition*) 10 – 14 mm, dan kriteria sangat kuat (*very strong inhibition*) seluas 15 – 18 mm. Berdasarkan kriteria tersebut dapat dikemukakan bahwa aktifitas penghambatan isolat uji sangat kuat terhadap *Shigella disenti* dan *Vibrio*

cholera, sedangkan terhadap terhadap *Salmonella thypi* ada pada kisaran sedang. Sementara penghambatan terhadap *Escherichia coli* ATCC 2592 tidak ada.

Kemampuan tersebut diduga karena *Vibrio cholera*, *Shigella disenti* dan *Salmonella thypi* memiliki struktur dinding sel yang relatif sederhana sehingga memudahkan senyawa antimikroba untuk masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Sementara *Escherichia coli* termasuk kelompok bakteri Gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang relatif lebih kompleks, berlapis tiga yaitu lapisan luar yang berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa lipopolisakarida yang memiliki sistem seleksi terhadap zat-zat asing (Brannen dan Davidson dalam Zuhud dkk., 2001) dan lapisan dalam yang berupa peptidoglikan. Pelczar dan Chan (1986) lebih lanjut menyebutkan bahwa *E. coli* merupakan bakteri patogen yang cenderung tahan terhadap lingkungan asam karena dapat ditemukan pada beberapa makanan dengan pH rendah. Penelitian Blanchette dkk., (1996) mengungkapkan bahwa *E. coli* mempunyai ketahanan yang tinggi terhadap asam asetat, asam sitrat, dan asam laktat pada konsentrasi hingga 1,5 %.

Zona jernih yang terbentuk juga menunjukkan adanya perbedaan kemampuan daya hambat. *Pediococcus pentosaceus* terhadap *Salmonella thypi* dan *Leuconostoc mesenteroides* terhadap *Salmonella thypi* memperlihatkan zona hambat yang lebih jernih dibandingkan dengan *Pediococcus pentosaceus* terhadap *Vibrio cholera* dan *Streptococcus thermophilus* terhadap *Shigella disenti*. Zona hambat yang lebih jernih diduga menunjukkan kemampuan bakteri tersebut sebagai baktisidal sedangkan yang kurang jernih terindikasi hanya bersifat bakteriostatik. Selanjutnya juga ditunjukkan bahwa Isolat *Streptococcus thermophilus* tidak mampu menghambat *V. cholera* dan *S. thypii*, *Pediococcus pentosaceus* dan *Leuconostoc mesenteroides* tidak mampu menghambat *S. disenti* dan *E. Coli* ATCC 2592.

Ketahanan *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* dan *Leuconostoc mesenteroides* terhadap antibiotik kloramfenikol ditunjukkan pada konsentrasi sebesar 0,05mg. Dari ketiga jenis bakteri tersebut hanya *Leuconostoc mesenteroides* yang tidak memperlihatkan penghambatan pada konsentrasi anti biotik 0,05mg dan berturut-turut diikuti oleh *Pediococcus pentosaceus* dan *Streptococcus thermophilus*. Fitriani dkk., (2006) menyebutkan bahwa antibiotik memiliki senyawa tunggal dengan mekanisme penghambatan terhadap bakteri yang spesifik. Jika terus menerus diberikan maka bakteri akan membuat pertahanan diri terhadap senyawa tersebut yang akhirnya membuat bakteri menjadi resisten.

Secara umum *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Leuconostoc mesenteroides* mempunyai ketahanan yang tinggi terhadap garam empedu atau *bile*

salt sebab mampu hidup pada media yang mengandung garam empedu. Menurut Kimoto dkk., (1999), Zavaglia dkk., (1998) Jacobsen dkk., (1999) dan Surono dan Nuraini (2001) menyebutkan bahwa semua mikroba yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam GYP Agar yang ditambahkan 2% garam empedu, dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu.

Ketahanan *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Leuconostoc mesenteroides* terhadap asam (pH 3) ditunjukkan dengan penurunan jumlah bakteri yang tumbuh setelah perlakuan asam sebesar 4 siklus log. Menurut Kimoto dkk., (1999), Zavaglia dkk., (1998) dan Jacobsen dkk., (1999), semua mikroba yang berhasil bertahan pada kondisi pH rendah dinyatakan bersifat resisten terhadap asam sehingga dapat dijadikan kandidat probiotik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Uji penghambatan terhadap bakteri patogen menunjukkan bahwa *Streptococcus thermophilus* (IKH-1) mampu menghambat *Shigella disenti* dengan rata-rata zona hambat sebesar 16,28 mm (*sangat kuat*). *Pediococcus pentosaceus* (IKH-2) menghambat *Vibrio cholera* sebesar 18,50 mm (*sangat kuat*) dan *Salmonella thypi* sebesar 7,91 mm (*sedang*). Isolat *Leuconostoc mesenteroides* (IKH-8) mampu menghambat *Salmonella thypi* dengan rata-rata zona jernih sebesar 8,25 mm. Ketiga jenis isolat uji tidak mampu menghambat *E. coli* ATCC 2592 dan tahan terhadap antibiotik, *bile salt* 2% dan asam.

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui produksi bakteriosin dari *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, dan *Leuconostoc mesenteroides* yang berasal dari tape biji teratai agar informasi mengenai kemampuan isolat uji sebagai probiotik menjadi lebih luas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan Terima Kasih disampaikan Kepada Dirjen Pendidikan Tinggi atas Dana Hibah Bersaing Tahun 2009 – 2010.

DAFTAR PUSTAKA

- Blanchette, L, D. Roy, G. Belanger and S.F. Gauthier. (1996). Production of Cottage Cheese Using Dressing Fermented by Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* **79** : 8 - 15.
- Fitriani, Y., Soekarto, S.T., Khairina, R. (2006). *Pemanfaatan Biji dan Umbi Teratai Sebagai Pangan Fungsional (Anti Diare dan Prebiotik)*. Hibah Bersaing. UNLAM. 81 halaman.

- Gariga, M., M. Hugas, T. Aymerich and J.M. Monfort. (1983). Bacteriogenic activity of lactobacilli from fermented sausage. *App. Bacteriol.*, **75**:142-148.
- Jacobsen CN, VR Nielsen, AE Hayford, PL Moller, KF Michaelsen, AP Erregaard, B Sandstrom, M Tvede dan M Jacobsen. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty Seveb Strains on *Lactobacillus spp.* By in Vitro Technique and Evaluation oh The Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *J. Appl. An Environ.* **65** :4949-4956.
- Khairina, R., I.K.Khotimah, dan E.S. Rahayu. (2007). *Potensi Tape Biji Teratai (Nymphaea pubecens Willd) Sebagai Makanan Fungsional*. Hibah Pekerti tahun I. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarmasin. 65 halaman.
- Khairina, R., I.K.Khotimah, dan E.S. Rahayu. (2008). Suplementasi *Lactobacillus acidophilus*- SNP 2 Pada Pembuatan Tape Biji Teratai. *Majalah Ilmu dan Teknologi Pertanian, Agritech* **28**: 186 – 191.
- Khotimah, I.K dan R. Khairina. (2009). *Produksi Tape Biji Teratai (Nymphaea pubecens Willd) Sebagai Probiotik*. Hibah Bersaing tahun I. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarmasin. 74 Halaman.
- Kimoto H, J Kurisaki, NM Tsuji, S Ohmomo dan T. Okamoto. (199). *Lactococci* as Probiotic strain : Adhesion to Human Enterocyte-like Caco-2 cells and Tolerance to low pH and bile. *Lett. In Appl. Microbiol.* **29**:313-316.
- Lade, H. S., M. P. Chitanand, G. Gyananath, T. A. Kadam. (2006). Studies on Some Properties of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus* Spesies Isolated from Agro-Based Waste. *The Internet Journal of Microbiology*. [http://www. bioline .org. br/request?jb04071](http://www.bioline.org.br/request?jb04071). [20 Desember 2006].
- Lay, B. W. dan S. Hastowo. (1992). *Mikrobiologi*. Rajawali Pers, Jakarta.
- Pelczar, M. J. dan E.C.S. Chan. (1986). *Dasar-dasar Mikrobiologi 1*. UI-Press, Jakarta.
- Rahayu, E.S. (2001). *Prebiotik, Probiotik dan Makanan Sehat*. Makalah Pada Seminar Regional Fakultas Biologi Universitas Atmajaya, Yogyakarta. 22 Juni 2001.
- Rahayu, E.S. (2004). *Makanan Fermentasi dan Probiotik*. Makalah Seminar Nutrigenoik dan Makanan Hasil Fermentasi. Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Surono, I.S. dan D. Nurani. (2001). *Exploration of Indigenous Acid Bacteria From Dadih of West Sumatera for Good Starter Cultur and Probiotic Bacteria*. Research Report. Domestic Collaborative Reasearch Grant (DCRG). URGE Project 2000-2001.
- Wiryawan, K. G., Anita, S. T., Rarah, R. A., Eliyana, D. J. (2003). Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Antimikroba. *Jurnal Veteriner (Veterinary Journal)*. <http://www.jvetunud.com/archieves/60/>. [23 April 2006].
- Zuhud, E. A. M., W.P. Rahayu, H. Wijaya, & P.P. Sari. (2001). Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kedawung (*Parkia roxburghii* G. Don) Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **XII**.: 6-11.
- Zavaglia AG, G Kociubinski, P Perez dan G De Antoni. (1998). Isolation and Characterization of Bifidobacterium strain for Probiotic Formulation. *J. Food Protect.* **61**: 865-873.